

Coagulation Factor Xa inhibitor, useful for treatment, prophylaxis or diagnosis of thromboembolic disease, comprising acylated 3- or 4-amidino-benzylamine derivative

Publication number: DE10029015 (A1)

Publication date: 2001-12-20

Inventor(s): STUERZEBECKER JOERG [DE]; STEINMETZER TORSTEN [DE]; KUENZEL SEBASTIAN [DE]; SCHWEINITZ ANDREA [DE] +

Applicant(s): CURACYTE AG [DE] +

Classification:





- **international:** **A61K38/00; A61P7/02; A61P9/00; A61P43/00; C07C257/18; C07C259/18; C07K5/06; C07K5/068; A61K38/00; A61P7/00; A61P9/00; A61P43/00; C07C257/00; C07C259/00; C07K5/00; (IPC1-7): C07K5/06; A61K38/05; A61K49/00; C12N9/99**

- **European:** C07C257/18; C07C259/18; C07K5/06A1F; C07K5/06A1F1; C07K5/06B

Application number: DE20001029015 20000615

Priority number(s): DE20001029015 20000615

Also published as:

 US2003166577 (A1)
 US6841701 (B2)
 JP2004503563 (T)
 EP1294741 (A2)
 EP1294741 (B1)

[more >>](#)

Abstract of DE 10029015 (A1)

A novel coagulation Factor Xa inhibitor comprises an acylated 3- or 4-amidino-benzylamine derivative (I). A novel coagulation Factor Xa inhibitor comprises an acylated 3- or 4-amidino-benzylamine derivative of formula (I). X = CH or N; R1 = H, 1-8C alkyl or -(CH2)nOH; n = 1-5; R2 = H or 1-8C alkyl; R3 = 1-8C alkyl or -(CH2)n-OR6; R4 = SO2R', COR', COOR' or H; R5 = H, OH, COR or COOR; R, R6 = 1-16C alkyl or (all optionally substituted) aryl, heteroaryl, aralkyl or heteroaralkyl; R' = as R; or an adamantyl or camphor residue; the amidino group is in the 3- or 4-position.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 29 015 A 1**

⑤1 Int. Cl.7:
C 07 K 5/06
A 61 K 38/05
A 61 K 49/00
C 12 N 9/99

②1 Aktenzeichen: 100 29 015.9
②2 Anmeldetag: 15. 6. 2000
④3 Offenlegungstag: 20. 12. 2001

DE 100 29 015 A 1

⑦1 Anmelder:
Curacyte AG, 80339 München, DE

⑦4 Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,
Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, 81679
München

⑦2 Erfinder:
Stürzebecher, Jörg, Dr.rer.nat., 99094 Erfurt, DE;
Steinmetzer, Torsten, Dr.rer.nat., 07743 Jena, DE;
Künzel, Sebastian, Dipl.-Bio.-Chem., 07743 Jena,
DE; Schweinitz, Andrea, Dipl.-Chem., 07745 Jena,
DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤4 Hemmstoffe für den Gerinnungsfaktor Xa
- ⑤7 Es soll ein auch für therapeutische Anwendungen geeigneter Wirkstoff angegeben werden, der diesen Gerinnungsfaktor Xa mit hoher Aktivität und Spezifität hemmt und der mit möglichst geringem Syntheseaufwand herstellbar ist.
- Überraschend wurde gefunden, dass Derivate des Amidino-benzylamins, insbesondere solche des 4-Amidino-benzylamins, mit zwei gebundenen Aminosäuren eine neue Gruppe von hochaktiven und sehr selektiven F Xa-Hemmstoffen darstellen.
- Die Hemmstoffe F Xa werden für medizinische Anwendungen, beispielsweise zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen und thrombotischer Ereignisse, eingesetzt.

DE 100 29 015 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe für den Gerinnungsfaktor Xa zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen und zur Verhinderung thromboembolischer Ereignisse.

5 [0002] Die gegenwärtig klinisch eingesetzten Antikoagulantien vom Heparin-Typ bzw. die Vitamin-K-Antagonisten werden nicht allen Anforderungen an ein "ideales" Antithrombotikum gerecht. Deshalb wird mit kleinenmolekularen Hemmstoffen der Gerinnungsenzyme, speziell von Thrombin und Faktor Xa (F Xa), nach Alternativen gesucht. Ein besonderer Vorteil von F Xa-Hemmstoffen im Vergleich zu Thrombin-Hemmstoffen könnte die geringere Blutungsneigung sein, die sich bei verschiedenen Tierversuchen gezeigt hat. So wurde bei antithrombotisch effektiven Dosen die Blutungszeit nur minimal beeinflusst (J. M. Herbert et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 276, 1030–1038, 1996; K. Sato et al., Br. J. Pharmacol. 123, 92–96, 1998).

[0003] Die ersten nichtpeptidischen Verbindungen mit hoher Affinität für F Xa waren symmetrische Bis-benzamidine ($K_i = 13$ nM für die wirksamste Verbindung BABCH) (J. Stürzebecher et al., Thromb. Res. 54, 245–252, 1998). Auch das Naphthamidin-Derivat DX-9065a besitzt zwei basische Gruppen und hemmt F Xa selektiv mit einem $K_i = 24$ nM (T. Hara et al., Thromb. Haemost. 71, 314–319, 1994). Der mit DX-9065a strukturell verwandte Inhibitor YM-60828 (K. Sato et al., Eur. J. Pharmacol. 339, 141–146, 1997) ist noch wirksamer ($K_i = 1.3$ nM). Inzwischen wurde eine ganze Reihe weiterer bis-basischer Verbindungen beschrieben, bei denen z. B. zwei Benzamidin-Reste über einen Oxazolin-Ring ($K_i = 18$ nM) (M.L. Quan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 7, 2813–2818, 1997) bzw. eine Carboxymethylalkyl-Kette ($K_i = 34$ nM) verknüpft sind (T.P. Maduskuie et al., J. Med. Chem. 41, 53–62, 1998). Nachteil der bis-basischen Verbindungen ist insbesondere die geringe Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe.

[0004] Auch Hemmstoffe für F Xa, die nur eine basische Gruppe enthalten, wurden beschrieben. N-substituierte Amidino-phenoxy-pyridine ($K_i = 0,11$ nM für BX-807834) wurden auf der Basis von BABCH entwickelt (R. Mohan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 8, 1877–1882, 1998; G.B. Phillips et al., J. Med. Chem. 41, 3557–3562, 1998). Amide des N α -Adamantylloxycarbonyl-3-amidinophenylalanins ($K_i = 74$ nM für die wirksamste Verbindung) sind selektive Hemmstoffe des F Xa (S. Sperl et al., Biol. Chem. 381, 321–329, 2000), während N α -arylsulfonyl-aminoacylierte Ester des 3-Amidinophenylalanins eine geringe Hemmwirkung ($K_i = 840$ nM für TAPAM) besitzen (J. Stürzebecher et al., Thromb. Res. 54, 245–252, 1998). Die WO 96/10022 offenbart Hemmstoffe, die überhaupt keine starke Ladung mehr besitzen ($K_i = 3,0$ nM für die wirksamste Verbindung).

[0005] Bisher wurden nur wenige Peptide als Hemmstoffe für F Xa beschrieben, die sich von der Substrat-Sequenz Ile-Glu-Gly-Arg ableiten. Die von Kettner und Shaw (Thromb. Res. 22, 645–652, 1981) beschriebenen Chlormethylketone hemmen F Xa irreversibel und sind nicht für in-vivo-Anwendungen geeignet. Dagegen sind die Peptide SEL 2489 ($K_i = 25$ nM) und SEL 2711 ($K_i = 3$ nM) außerordentlich wirksam (J.A. Ostrem et al., Biochemistry 37, 1053–1059, 1998). Auch einige Peptidyl-Arginin-Aldehyde wurden beschrieben, die neben Argininal in P1-Position ein D-Arginin bzw. eine unnatürliche basische Aminosäure in P3 besitzen (Z.H. Jonathan, Bioorg. Med. Lett. 9, 3459–3464, 1999). Dagegen sind bisher keine Peptidyl-Agmatin-Derivate als Hemmstoffe für F Xa bekannt, obwohl dieser Inhibitor-Typ bei der Weiterentwicklung von Thrombin-Inhibitoren zu erheblichen Fortschritten geführt hat. Dabei waren die Erfolge bei Verbindungen des D-Phe-Pro-Arg-Typs mit C-terminalem Agmatin und davon abgeleiteten Derivaten besonders bemerkenswert. Es wurden picomolare K_i -Werte für die Thrombin-Hemmung erreicht und die orale Bioverfügbarkeit verbessert (T.J. Tucker et al., J. Med. Chem. 40, 1565–1569 und 3687–3693, 1997). Dabei wurde allerdings keine Hemmung des F Xa beobachtet. So hemmt Melagatran, welches C-terminal einen 4-Amidino-benzylamin-Rest besitzt und sehr unspezifisch ist, F Xa mit einem $K_i = 2,8$ μ M. Dagegen werden Trypsin ($K_i = 4,0$ nM) und Thrombin ($K_i = 2,0$ nM) mehr als drei Größenordnungen stärker gehemmt (D. Gustafsson et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 7, 69–79, 1996).

[0006] Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, einen auch für therapeutische Anwendungen geeigneten Wirkstoff anzugeben, der den Gerinnungsfaktor Xa mit hoher Aktivität und Spezifität hemmt und der mit möglichst geringem Synthesaufwand herstellbar ist.

[0007] Überraschend wurde gefunden, dass acyliertes Amidino-benzylamin gemäß der im Patentanspruch 1 angeführten allgemeinen Formel I, insbesondere Verbindungen des 4-Amidino-benzylamins, bei denen X, R₁, R₂ und R₃ natürliche und/oder unnatürliche Aminosäuren ergeben, Faktor Xa sehr wirksam und selektiv inaktivieren und die Gerinnung von menschlichem Blutplasma effektiv hemmen. Einen besonders aktiven Hemmstoff von Faktor Xa bildet dabei Amidino-benzylamin, wenn die Amidinogruppe in 4-Position steht, als Aminosäuren Glycin und D-Serin-Benzylether gebunden sind und wenn die Verbindung eine N-terminale Schutzgruppe R₄ aus einem Aryl- bzw. Aralkylsulfonyl-Rest aufweist.

[0008] Neben Faktor Xa wurden andere Enzyme deutlich weniger gehemmt, so dass die erfindungsgemäßen Derivate des Amidino-benzylamins eine neue Gruppe von hochaktiven und sehr selektiven F Xa-Hemmstoffen darstellen.

55 [0009] Die Verbindungen liegen in der Regel als Salze mit Mineralsäuren, bevorzugt als Hydrochloride, vor oder als Salze mit geeigneten organischen Säuren.

[0010] Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in prinzipiell bekannter Weise, wie nachfolgend beschrieben, hergestellt werden:

Die Ausgangsverbindung 4-Cyanobenzylamin wird über Gabrielsynthese (G. Wagner und I. Wunderlich, Pharmazie 32, 76–77, 1977; B.C. Bookser und T.C. Bruce, J. Am. Chem. Soc. 113, 4208–4218, 1991) aus 4-Cyanobenzylbromid hergestellt. Aus dem so hergestellten 4-Cyanobenzylamin wird das Boc-geschützte Acetyloxamidino-benzylamin gewonnen. Die Ankopplung der weiteren Aminosäuren und der Schutzgruppe R₄ erfolgt mittels Standardkopplungsmethoden mit Boc als N-terminale Schutzgruppe. Die zweite Aminosäure kann auch direkt als N-aryl- bzw. N-aralkyl-sulfonyl-geschützte Aminosäure gekoppelt werden. Die Peptidanaloga werden sequentiell, beginnend vom Acetyloxamidino-benzylamin, aufgebaut. Die meisten Produkte kristallisierten gut und lassen sich damit einfach reinigen. Die Reinigung der Hemmstoffe erfolgt in der letzten Stufe über präparative, reversed-phase HPLC.

[0011] Die Erfindung soll nachstehend anhand von drei Ausführungsbeispielen näher erläutert werden:

DE 100 29 015 A 1

Ausführungsbeispiel 1

Synthese von Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-Gly-4-Amidino-benzylamid \times HCl

1.1 Boc-4-Cyano-benzylamid

[0012] 20 g (0,151 mol) 4-Cyanobenzylamin wurden in 300 ml H_2O , 150 ml Dioxan und 150 ml 1 N NaOH gelöst. Unter Eiskühlung wurden 37,5 ml Di-tert.-butyl-dicarbonat zugetropft und eine Stunde bei $0^\circ C$ sowie weitere 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Dioxan wurde im i. V. entfernt und der wässrige Rückstand 3-mal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden 3-mal mit 5%-iger $KHSO_4$ - und 3-mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. V. eingengt (weiße Kristalle). HPLC: Acetonitril/ H_2O , Elution bei 44,1% Acetonitril. Ausbeute: 30,48 g (0,131 mol), 87%.

1.2 Boc-4-Acetyloxamidino-benzylamid

[0013] Nach Judkins et al. (Synthetic Comm. 26, 4351-4367, 1996) wurden 30,48 g (0,131 mol) Boc-4-Cyano-benzylamid mit 13,65 g (0,197 mol) Hydroxylamin \times HCl und 34 ml (0,197 mol) DIEA in 300 ml abs. Ethanol gelöst. Es wurde 2 Std. unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Ansatz i. V. eingengt, der Rückstand in ca. 200 ml Essigsäure gelöst und mit 18,67 ml (0,197 mol) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 1 Std. wurde erneut eingengt, in Essigester gelöst und bei $0^\circ C$ je 3-mal mit 5%iger $KHSO_4$ - und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 und Einengen i. V. fiel ein weißes Pulver an. HPLC: Acetonitril/ H_2O , Elution bei 32,0% Acetonitril. Ausbeute: 31,3 g (0,102 mol) 78%.

1.3 4-Acetyloxamidino-benzylamin \times HCl

[0014] 5 mmol Boc-4-Acetyloxamidino-benzylamid werden in 20 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird i. V. weitgehend eingengt, das Produkt mit trockenem Diethylether gefällt, abgefrittet, nochmals mit frischem Ether gewaschen und i. V. getrocknet. Auf Grund der quantitativen Umsetzung wurde das Produkt ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

1.4 Boc-Gly-4-Acetyloxamidino-benzylamid

[0015] Die Kopplung von Boc-Gly-OH (Orpegen, Heidelberg) an 4-Acetyloxamidino-benzylamin erfolgte nach Frerot et al. (Tetrahedron 47, 259 ff., 1991). Dazu wurden 2,064 g (9,3 mmol) 4-Acetyloxamidino-benzylamin \times HCl und 1,629 g (9,3 mmol) Boc-Gly-OH in ca. 25 ml DMF gelöst. Bei $0^\circ C$ wurden dann 4,84 g (9,3 mmol) PyBOP und 3,878 ml (27,9 mmol) TEA zugegeben und der pH-Wert mit TEA auf 9 eingestellt. Nach 1 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde i. V. eingengt, in Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer, basisch und neutral gewaschen, getrocknet und eingengt. Ausbeute: 3 g (8,2 mmol) 88%.

1.5 Boc-Gly-4-Amidino-benzylamid \times AcOH

[0016] 3 g (8,2 mmol) Boc-Gly-4-Acetyloxamidino-benzylamid wurden in 200 ml 90%iger Essigsäure gelöst. Anschließend wurden unter Argon 300 mg 10% Palladium auf Aktivkohle zugesetzt. Argon wurde durch eine Wasserstoffatmosphäre ersetzt und der Ansatz unter kräftigem Rühren 24 Std. hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat i. V. eingengt. Ausbeute: 2,9 g (7,9 mmol) 96%.

1.6 H-Gly-4-Amidino-benzylamid \times 2 HCl

[0017] 2,9 g (7,9 mmol) Boc-Gly-4-Amidino-benzylamid wurden in 100 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde i. V. weitgehend eingengt und mit trockenem Diethylether gefällt, danach abgefrittet und das Produkt nochmals mit frischem Ether gewaschen. Nach Trocknen des Produkts i. V. wurde es ohne weitere Aufreinigung für die Synthese nach Punkt 1.8 eingesetzt.

1.7 Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-OH

[0018] 229 mg (1,173 mmol) H-D-Ser(Bz)-OH und 408 μ l (2,345 mmol) DIEA wurden in 50 ml 50% Acetonitril gelöst. Dann wurden 335 mg (1,76 mmol) Benzylsulfonylchlorid zugegeben und 12 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde i. V. eingengt, mit Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer und neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde i. V. eingengt. Ausbeute: 289 mg (0,827 mmol) 71%.

1.8 Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-Gly-4-Amidino-benzylamid \times TFA

[0019] 151 mg (0,433 mmol) Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-OH und 121 mg (0,433 mmol) H-Gly-4-Amidino-benzylamid \times 2 HCl wurden in wenig abs. DMF gelöst. Unter Eiskühlung wurden 225 mg (0,433 mmol) PyBOP und 230 μ l

DE 100 29 015 A 1

(1,32 mmol) DIEA zugegeben. Nach 1 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde i. V. eingeeengt und das Produkt über HPLC gereinigt (Acetonitril/H₂O, 0,1% Trifluoressigsäure, Elution bei 37,4% Acetonitril). Ausbeute: 232 mg (0,356 mmol) 82%.

Ausführungsbeispiel 2

Hemmung von F Xa durch ausgewählte Verbindungen mit Y = Amidino

R ₄	Konfiguration R ₃	R ₃	R ₂	X-R ₁	Position Amidino	K _i , µM
H	L	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	> 1000
Boc	L	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	110
H	D	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	> 1000
Ac	D	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	> 1000
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	3,0
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -O-Bz	H	CH ₂	4	0,050
H	D	CH ₂ -O-Bz	H	CH ₂	3	140
Boc	D	CH ₂ -O-Bz	H	CH ₂	3	93
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -O-Bz	H	CH ₂	3	84

Bestimmung der Hemmwirkung

[0020] Zur Bestimmung der Hemmwirkung wurden 200 µl Tris-Puffer (0,05 M, 0,154 M NaCl, 5% Ethanol, pH 8,0; enthält den Inhibitor), 25 µl Substrat (Moc-D-Nle-Gly-Arg-pNA in H₂O; Pentapharm Ltd., Basel, Schweiz) und 50 µl F Xa (vom Rind, Diagnostic Reagents Ltd, Thame, GB) bei 25°C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bestimmt. Die K_i-Werte wurden nach Dixon (Biochem. J. 55, 170-171, 1953) durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K_i-Werte sind das Mittel aus mindestens drei Bestimmungen.

Ausführungsbeispiel 3

Hemmung der Gerinnung von humanem Plasma durch Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-Gly-4-Amidino-benzylamid

Konzentration µM	Verlängerung der Gerinnungszeit (%)	
	aPTT	PT
3,3	385	386
1,7	260	266
0,83	185	198
0,42	146	153
0,21	122	127
0,1	111	119

- Leerseite -